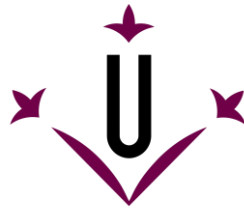


Análisis de nuevos métodos para la detección de adulteraciones en el aceite de oliva virgen extra



Universitat de Lleida

Facultad de Medicina

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Trabajo Final de Grado

Curso 2017-2018

Autora: Blanca Puertas Pujadas

Tutor: Robert Soliva Fortuny

Análisis de nuevos métodos para la detección de adulteraciones en el aceite de oliva virgen extra

Trabajo Final de Grado realizado por:

Blanca Puertas Pujadas

Tutorizado por: Robert Soliva Fortuny

ÍNDICE

1. Resúmenes	4
1.1 Resumen	4
1.2 Resum	5
1.3 Abstract.....	6
2. Introducción	7
2.1. El aceite de oliva	7
2.1.1 Tipos de aceite de oliva	7
2.1.2 Composición del aceite de oliva	10
2.1.3 Beneficios del aceite de oliva para la salud	15
2.1.4 Influencia del proceso de refinado en la composición del aceite de oliva.....	16
2.2 La adulteración del AOVE	17
2.2.1 Métodos empleados para la autenticación del aceite de oliva	18
3. Hipótesis	19
4. Objetivos de la investigación	20
5. Metodología	21
5.1 Espectroscopia Raman	22
5.2 Luminiscencia	24
5.3 Espectroscopia Brillouin	25
5.4 Conductividad térmica y método de tres-omega	26
6. Resultados y discusión.....	29
6.1 Espectroscopia Raman	29
6.2 Luminiscencia.....	32
6.3 Espectroscopia Brillouin	36
6.4 Conductividad térmica	37
7. Conclusiones	39
8. Trabajo futuro	40
9. Agradecimientos.....	41
10. Bibliografía	42

1. Resúmenes

1.1 Resumen

La autenticación del aceite de oliva y su adulteración con aceites de menor calidad sigue siendo un serio problema en la industria oleícola ya que los fraudes se siguen cometiendo. Los actuales métodos que se emplean para detectar estas adulteraciones requieren pasos previos complicados consumiendo una gran cantidad de tiempo y dinero. A demás, es preciso que los realice personal cualificado. Por eso, existe una necesidad urgente de investigar sobre métodos más simples, baratos y rápidos. En el presente trabajo se ha investigado el potencial de cuatro métodos de distintos para la autenticación del aceite de oliva virgen extra; tres espectroscópicos (Raman, Brillouin y luminiscencia) y uno térmico a través de la conductividad térmica. Se utilizó aceite de oliva virgen extra y muestras del mismo adulterado con otros aceites (aceite de orujo, girasol, girasol alto oleico, maíz y mezcla de soja y nuez). En ninguno de ellos las muestras requieren ningún tipo de preparación previa lo cual es una gran ventaja. La espectroscopia Raman y la luminiscencia resultan ser unos métodos simples y eficaces adecuados para los test in-situ. Contrariamente, la espectroscopia Brillouin y la conductividad térmica no resultan ser buenos métodos para la autenticación del AOVE.

Palabras clave: aceite de oliva, adulteración, espectroscopia, Raman, luminiscencia.

1.2 Resum

L'autenticació de l'oli d'oliva i la seva adulteració amb olis de pitjor qualitat segueix sent un seriós problema en la indústria oleícola ja que els fraus encara es duen a terme. Els actuals mètodes que s'empren per detectar aquestes adulteracions requereixen passos previs complicats i consumeixen una gran quantitat de temps i diners. A més, cal que els faci personal qualificat. Per això, existeix una urgent necessitat d'investigar sobre mètodes més simples, barats i ràpids. En el present treball s'ha investigat el potencial de quatre mètodes diferents per a l'autenticació de l'oli d'oliva verge extra; tres òptics (espectroscòpia Raman, luminescència i espectroscòpia Brillouin) i un tèrmic a través de la conductivitat. Es va utilitzar oli d'oliva verge extra i mostres del mateix adulterat amb altres olis (oli d'orujó, gira-sol, gira-sol alt oleic, blat de moro i barreja de soja i nou). En cap d'ells les mostres requereixen cap tipus de preparació prèvia la qual cosa és un gran avantatge. L'espectroscòpia Raman i la luminescència resulten ser uns mètodes simples i eficaços adequats per als test in-situ. Contràriament, l'espectroscòpia Brillouin i la conductivitat tèrmica no resulten ser bons mètodes per a l'autenticació de l'AOVE.

Paraules clau: oli d'oliva, adulteració, espectroscòpia, Raman, luminescència.

1.3 Abstract

The authentication of olive oil and its adulteration with cheaper oils is still a serious problem in the olive oil industry as frauds continue to be committed. The current methods used to detect such adulterations require complicated previous steps, consuming time and money. In addition, these techniques must be done by qualified staff. Therefore, there is an urgent need to investigate simpler, cheaper and faster methods. In the present work, the potential of four different methods for the authentication of extra virgin olive oil has been investigated; three optics (Raman spectroscopy, luminescence and Brillouin spectroscopy) and a thermal one through conductivity. Extra virgin olive oil and samples of the same adulterated with other oils (pomace oil, sunflower oil, high oleic sunflower, corn and soybean and walnut mixture) were used. In none of them the samples require any kind of prior preparation, which is a great advantage. Raman spectroscopy and luminescence turn out to be simple and effective methods suitable for in-situ tests. Conversely, Brillouin spectroscopy and thermal conductivity are not good methods for EVOO authentication.

Key words: olive oil, adulteration, spectroscopy, Raman, luminescence.

2. Introducción

2.1. El aceite de oliva

Según el Código Alimentario Español CAE, Aceite de oliva es el líquido extraído de los frutos maduros del olivo.¹ El Convenio Internacional del Aceite de Oliva de 1986 reserva la denominación de << Aceite de oliva>> únicamente al zumo extraído del fruto del olivo, por medios mecánicos y en condiciones térmicas que no alteren la naturaleza del aceite.

Cuando el aceite de oliva se obtiene por sistemas exclusivamente físicos de elaboración y procede de frutos frescos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones y con la adecuada madurez, exhibe excepcionales características sensoriales. Pero no todo el aceite de oliva que se produce reúne las condiciones antes citadas. Importantes cantidades de este producto han de ser destinadas a refinación, por presentar características organolépticas desagradables y/o un deterioro en los parámetros físico-químicos legalmente establecidos para evaluar su nivel de calidad comercial². Esto conlleva a que haya distintos tipos de aceite de oliva.

2.1.1 Tipos de aceite de oliva

Dentro de los aceites de oliva podemos distinguir varios tipos que pueden clasificarse de formas diversas, según la cantidad de variedades usadas, método de extracción, parámetros de calidad, etc. Sin embargo, la clasificación usada en este trabajo es la que atiende al Código Alimentario Español CAE¹. Según este, los aceites de oliva se clasifican en:

- **1. Aceites de oliva vírgenes.** Aceites de oliva extraídos por procedimientos mecánicos, en frío, sin que hayan sido sometidos a otras manipulaciones que las de sedimentación, centrifugación o filtración, ni llevar mezcla de ningún aceite o aceites de otra naturaleza u obtenidos de distinta forma, con las calidades siguientes:
 - a) Extra: Aceite de oliva de sabor intenso y cuya acidez en ácido oleico deberá ser como máximo, de un gramo por 100 gramos.
 - b) Fino: Aceite de oliva que reúne las condiciones del aceite de oliva virgen extra, salvo en cuanto a la acidez en ácido oleico, que será, como máximo, 1,5 gramos por 100 gramos.
 - c) Corriente: Aceite de oliva de buen sabor y cuya acidez en ácido oleico será de tres gramos por 100 gramos como máximo, con un margen de tolerancia de 10 gramos por 100 gramos respecto a la acidez indicada.
 - d) Lampante: Aceite de oliva de sabor defectuoso o cuya acidez en ácido oleico sea superior a 3 gramos por 100 gramos. No comestible.
- **2. Aceites de oliva refinados.** Obtenidos por refinación de los aceites de oliva vírgenes o de los extraídos directamente de la aceituna por otros procedimientos autorizados.

- **3. Aceites puros de oliva.** Compuestos de una mezcla de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva refinado.
- **4. Aceites de orujo de aceituna.** Obtenidos por tratamiento de orujo de aceituna con un disolvente autorizado.
- **5. Aceites refinados de orujo de aceituna.** Obtenidos por refinación de los aceites de orujo de aceituna y que reúnan los caracteres de las grasas comestibles refinadas. Las mezclas de aceite de orujo refinado y de aceite de oliva virgen, destinadas al consumo interior exclusivamente, se denominan «Aceite de orujo refinado y de oliva». Estas mezclas no podrán denominarse simplemente «Aceite de oliva» o «Aceite».
- **6. Aceites de orujo de aceituna para usos industriales.** Todos los demás aceites de orujo de aceituna.

La **Figura 1** muestra un mapa conceptual sobre los distintos tipos de aceite de oliva según su método de obtención y acidez libre.



Figura 1. Esquema de los distintos tipos de aceite de oliva³.

2.1.2 Composición del aceite de oliva

La composición del aceite de oliva presenta ciertas variaciones según su origen, variedad de aceituna, calidad de la misma y otros factores, aunque se pueden definir unos parámetros generales.

Desde un punto de vista químico, los componentes del aceite de oliva suelen dividirse en una fracción saponificable, que es la parte propiamente grasa, y otra fracción muy pequeña respecto al peso total del aceite, (entre el 1 y el 2%), llamada fracción insaponificable, de enorme importancia en cuanto a los componentes saludables que contiene.

- **Fracción saponificable:** compuesta mayoritariamente por triglicéridos y una pequeña proporción de ácidos grasos libres junto con otros componentes con ácidos grasos esterificados, como: mono o diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides⁴. Esta parte constituye el 98-99% del total.

En el aceite de oliva existe un claro predominio del **ácido oleico**. El porcentaje de ácido oleico en los aceites de oliva puede oscilar entre el 55 y el 83% respecto al total de ácidos grasos.

El que contiene porcentajes más altos es el aceite de oliva **virgen extra**⁵. Por el contrario, el aceite de oliva presenta un bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) y saturados (palmítico y esteárico).

- **Fracción insaponificable:** la componen una serie de sustancias muy diversas no glicéridas, denominadas componentes menores o secundarios del aceite de oliva. La proporción de estos últimos elementos en el aceite es muy minoritaria (1-3 % en peso). Se incluyen en esta fracción casi la totalidad de los componentes del aceite que no son ácidos grasos, así como la mayoría de los componentes saludables y también los aromáticos. La fracción insaponificable del aceite se obtiene tras la saponificación con un hidróxido alcalino y la extracción con un disolvente. De este modo, los constituyentes menores son compuestos no relacionados químicamente con los ácidos grasos, como hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides, tocoferoles, carotenoides, clorofilas y compuestos fenólicos⁶.

A continuación, la **Tabla 1** muestra la información nutricional del aceite de oliva⁷.

Tabla 1. Composición del aceite de oliva.

Nutriente	Valor
Calorías	884.0 kcal
Agua (humedad)	0.0-0.1 g
Hidratos de Carbono	0.0 g
Proteínas	0.0 g
Grasa total	99 g
Ceniza	0.0 g
Vitaminas	Valor
Vitamina C, B1, B2, B3, B5, B6, B12	0.0 g
Folato	0.0 g
Vitamina A	trazas
Vitamina E	14.35 mg
Vitamina D	0.0 mcg
Vitamina K1	60.2 mcg
Vitamina E	Valores
Beta Tocoferol	0.11 mg
Gamma Tocoferol	0.83 mg
Delta Tocoferol	0.0 mg
Vitamina E	14.35 mg
Minerales	Valores
Calcio	1.0 mg
Hierro	0.56 mg
Magnesio, Fósforo, Zinc, Cobre, Manganeseo	0.0 mg
Potasio	1.0 mg
Sodio	2.0 mg
Selenio	0.0 mcg
Esteroles	Valor
Colesterol	0.0 mg
Fitoesteroles totales	221.0 mg
Ácidos grasos	Valor
Ácidos grasos saturados	13.808 g
Ácidos grasos monoinsaturados	72.961 g
Ácidos grasos poliinsaturados	10.523 g
Ácidos grasos saturados	Valor
Ácido Hexanoico, Caprílico, Cáprico, Láurico, Mirístico, Lignocérico	0.0 g
Ácido Palmítico	11.29 g
Ácido Heptadecanoico	0.022 g
Ácido Esteárico	1.953 g
Ácido Araquídico	0.414 g
Ácido Behénico	0.129 g
Ácidos grasos monoinsaturados	Valor
Ácido Miristoleico, Docosenoico	0.0 g
Ácido Palmitoleico	1.255 g
Ácido Heptadecenoico	0.125 g
Ácido Oleico	71.269 g
Ácido Gadoleico	0.311 g
Ácidos grasos poliinsaturados	Valor
Ácido Linoleico	9.762 g
Ácido Linolénico	0.761 g
Ácido Parinarico, Eicosatetraenoico, EPA, DPA, DHA	0.0 g

El aceite de oliva no contiene carbohidratos ni proteínas. Es una grasa vegetal que se diferencia de otras grasas vegetales en su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. La presencia de ácidos grasos libres le confiere al aceite su carácter más o menos ácido, dependiendo de la mayor o menor concentración de éstos.

Como se ha nombrado anteriormente, la composición del aceite de oliva varía en función de diversos factores como son: variedad de aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas, y características tecnológicas de producción. Además, la composición en ácidos grasos también difiere de un aceite de oliva a otro, dependiendo de la zona de producción. Los factores principales que afectan a la composición en ácidos grasos son: latitud, condiciones climáticas, variedad y grado de madurez de las aceitunas recogidas⁸.

El conocimiento de la composición de ácidos grasos del aceite de oliva, tanto cuantitativa como cualitativamente, ha sido siempre un tema de gran interés debido a su importancia en la descripción y detección de posibles adulteraciones.

La **Figura 2** muestra la estructura química de los ácidos grasos mayoritarios del aceite de oliva: ácido oleico, con un doble enlace en su estructura, y representa el ácido graso mayoritario, ácido palmítico, que es el ácido graso saturado mayoritario y ácido linoleico que representa el ácido graso poliinsaturado mayoritario.

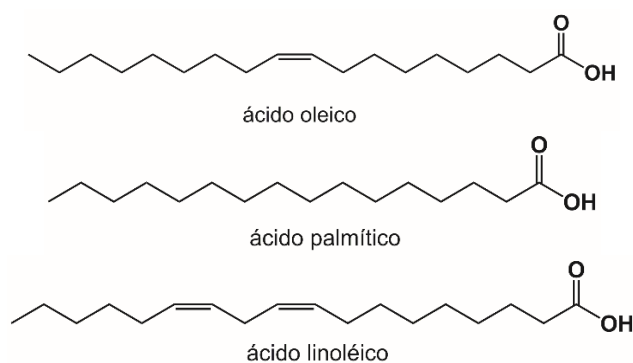


Figura 2 Ácidos grasos mayoritarios en el aceite de oliva.

Aunque supone una pequeña parte de la composición, la fracción minoritaria del aceite incluye una gran variedad de compuestos químicos. Es muy difícil determinar de forma precisa la totalidad de los constituyentes menores, debido a su naturaleza compleja y a su baja concentración. Además, algunos de los constituyentes menores sólo están presentes en el aceite crudo, y el procesado tecnológico como la refinación los elimina, como es el caso de los compuestos fenólicos. He aquí una de las razones por las cuales el aceite de oliva virgen tiene un valor añadido a nivel de composición, ya que es un aceite que, como se ha nombrado anteriormente, no padece ningún tipo de proceso térmico en el cual pueda perder estos compuestos tan interesantes para la salud.

Las diversas clases de constituyentes menores pueden dividirse en dos grupos:

- **Derivados de ácidos grasos:** tales como fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides.
- **No derivados de ácidos grasos:** incluye compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos, como hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos.

Cabe destacar que los hidrocarburos esteroideos no se encuentran de forma natural, o en cantidades por debajo de 0,15 mg/kg en los aceites de oliva virgen. Esto se debe a que estos hidrocarburos se generan durante los procesos de refinado, a los que no es sometido el aceite de oliva virgen⁸.

El aceite de oliva también está compuesto por otros componentes como:

- **Tocoferoles.** Se han identificado varios tocoferoles aislados (α , β y δ), pero el principal homólogo de las formas de vitamina E presentes es el α -tocoferol, representando aproximadamente el 90-95% de los tocoferoles totales⁸. Son formidables agentes antioxidantes naturales y confieren estabilidad al aceite.
- **Pigmentos.** Son los responsables de la coloración del aceite, y éstos están involucrados en los mecanismos de auto-oxidación y en la foto-oxidación de dicho aceite. Se dividen en dos grupos: clorofilas y feofitinas, por un lado, y los carotenoides, por otro. El primer grupo es el responsable de la coloración verde y el segundo de la amarilla. El carotenoide mayoritario es la luteína. Estos pigmentos presentes en el aceite dependen de la variedad y del grado de maduración del fruto⁸.
- **Compuestos fenólicos.** Son compuestos que no están presentes en ningún otro tipo de aceite vegetal. Se les atribuyen varias funciones, entre las que cabe citar su actividad antimicrobiana y protección frente al daño oxidativo, actuando como captadores de radicales libres y quelantes de metales. Éstos también afectan al sabor y aroma, contribuyendo por tanto a las propiedades organolépticas del aceite. Se han relacionado con los atributos de astringencia y amargor⁸.

Comparación de la composición de distintos tipos de aceites.

De acuerdo con la información proporcionada por la Base de Datos Española de Composición de Alimentos Bedca⁵, se muestra a continuación una pequeña comparativa en distintos componentes del aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva y el aceite de girasol:

Tabla 2 Componentes del AOVE, el aceite de oliva y el aceite de girasol⁵ (los valores se expresan por 100g de porción comestible).

Componentes	Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE)	Aceite de oliva	Aceite de girasol
Energía	888 kcal	887 kcal	887 kcal
Ácidos grasos monoinsaturados	78.2 g	71 g	25.38
Ácidos grasos poliinsaturados	7.5 g	11.93 g	63.5 g
Ácidos grasos saturados	14.21 g	17.06g	10.62
Ácido oleico	78.2 g	69.16 g	28.06 g
Ácido linoleico	6.8 g	11.28 g	57.53 g
Ácido linolénico	0.7 g	0.69 g	1.6 g
Vitamina E	18.34 g	12 mg	56 mg

Como se observa en la **Tabla 2**, los tres aceites aportan la misma cantidad de kilocalorías, por lo que no hay diferencias a nivel energético. Los ácidos grasos que se consideran más saludables son los monoinsaturados, cuya cantidad es superior en el aceite de oliva virgen extra. El que contiene menor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados es el aceite de girasol. Hay una diferencia notable en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados siendo el de girasol el que más contiene, y el AOVE el que menos contiene. Debido este bajo contenido, es el aceite de oliva más estable, ya que tiene una excelente resistencia frente a la oxidación y por ello es el menos propenso a producir sustancias peligrosas para la salud⁹. Esto también se debe a su alto contenido en polifenoles.

El aceite con menos ácidos grasos saturados de los tres es el de girasol, aunque cabe decir que la diferencia es leve. El aceite de oliva virgen extra es el que contiene mayor cantidad de ácido oleico (78,2 g por cada 100g de aceite), y la diferencia es destacable si se compara con el aceite de girasol. Este último también supera a los otros dos en cuanto a contenido de ácido linoleico, linolénico y vitamina E.

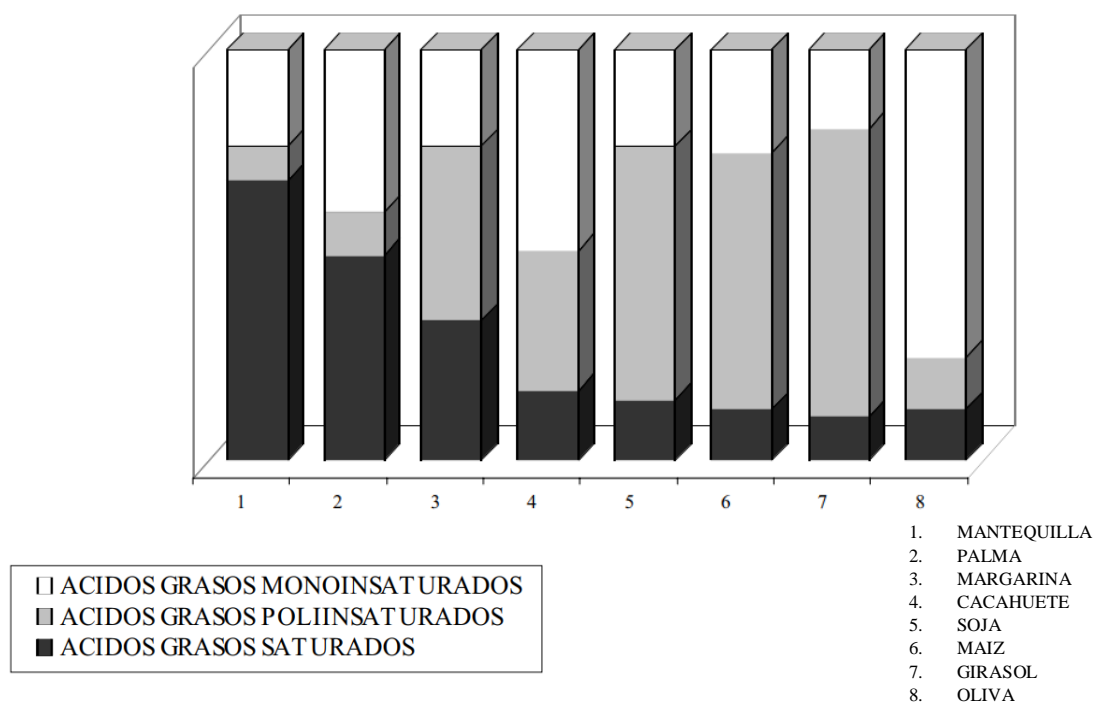


Figura 3 Composición en ácidos grasos de distintas grasas comestibles¹⁰.

Haciendo referencia a lo anteriormente citado y como se observa en la **Figura 3** el aceite de oliva es el aceite más saludable por su buen perfil lipídico, es decir, por la presencia de ácidos grasos monoinsaturados en su composición.

2.1.3 Beneficios del aceite de oliva para la salud

El aceite de oliva es un alimento altamente energético. Aporta 9kcal/g provenientes de sus ácidos grasos, por lo que contribuye con al menos un 15% de la energía en la dieta mediterránea. Pero más allá de su alto valor energético, presenta efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores que lo convierten en un alimento funcional. Algunos de sus beneficios conocidos y estudiados son:

- Su alto contenido en ácido oleico. Un ácido graso monoinsaturado del grupo Omega 9 que es fundamental para la salud, ya que es esencial. Éste actúa como agente hipotensor, disminuyendo la presión arterial y los niveles de triglicéridos en sangre. Además, juega un papel fundamental en el mantenimiento del peso corporal, ya que interviene en la regulación metabólica de los lípidos¹¹. Como se ha comentado anteriormente, el ácido oleico resiste mayor las altas temperaturas al ser un ácido graso monoinsaturado, y por lo tanto, la producción de radicales libres durante procesos térmicos en la cocina es mucho menor⁹.
- Alto contenido en compuestos fenólicos (polifenoles). Son unos compuestos con alta capacidad antioxidante y anti-inflamatoria. En el caso del aceite de oliva estos protegen a los propios ácidos grasos del aceite frente a la oxidación, con lo que previenen que las grasas se oxiden en el torrente sanguíneo e impiden la formación de placas de ateromas en los vasos¹².

En el encuentro científico denominado «Estado de los conocimientos sobre el aceite de oliva, la nutrición y la salud», realizado en Madrid en marzo de 2005, se concluyó que:

- El aceite de oliva reduce los niveles plasmáticos de LDL-colesterol y mejora la relación LDL/HDL aterogénica cuando éste sustituye a una dieta rica en grasas saturadas.
- Reduce los triglicéridos plasmáticos y aumenta los niveles de HDL-colesterol, en comparación con una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono.
- Mejora el metabolismo lipoproteico postprandial y cuando sustituye a una dieta rica en PUFA (Ácidos grasos poliinsaturados), reduce la susceptibilidad de las LDL a la modificación oxidativa.
- Mejora el metabolismo de los hidratos de carbono en pacientes con diabetes tipo 2.
- Reduce la presión sanguínea y el riesgo de hipertensión.
- Mejora la vasodilatación y la respuesta inflamatoria.
- Previene la obesidad y aumenta la actividad lipolítica del tejido adiposo.

Otro aspecto beneficioso del aceite de oliva es su menor impregnación en los alimentos en comparación con otros aceites ¹¹, lo que hace que los alimentos resulten menos calóricos sobretodo cuando se someten a procesos de freído.

Es importante tener en cuenta que tanto el ácido oleico (monoinsaturado) como el ácido linoleico (poliinsaturado) contenidos en el aceite de oliva, son fundamentales para la salud, ya que son esenciales, es decir que el organismo no es capaz de sintetizarlos por sí mismo y tiene que incorporarlos mediante la dieta. Además, al ser el aceite de oliva el zumo procedente de la aceituna, conserva todas las propiedades biológicas del fruto, incluidas vitaminas y antioxidantes, lo cual no ocurre en el caso de aceites de semillas, que como se ha mencionado anteriormente, se obtienen mediante extracción con disolventes. A todo esto, hay que destacar que el aceite de oliva virgen es preferible consumirlo con una dieta saludable y natural como es la dieta mediterránea. Esta se basa en la ingesta de frutas, verduras, cereales, lácteos, pescados en abundancia y pocas carnes¹⁰. La sustitución de las grasas saturadas por el aceite de oliva es una de las claves para una buena salud.

2.1.4 Influencia del proceso de refinado en la composición del aceite de oliva

A menudo puede que la composición natural del aceite de oliva se encuentre alterada por culpa de contaminaciones externas, fermentaciones diversas, o un prensado y centrifugado deficiente. Esto hace que la acidez del aceite sea excesiva al haber numerosas moléculas de ácidos grasos libres, y que además el aceite posea restos sólidos y/o compuestos volátiles de olor y sabor desagradables. Estos se denominan “aceites lampantes”, porqué como se ha descrito anteriormente, no son aptos para el consumo humano. Sin embargo, mediante el proceso de refinado estos se pueden volver aptos para dicho consumo¹³.

Durante el refinado, con el proceso de neutralización se eliminan los ácidos grasos libres del aceite. Más tarde, en la operación de decoloración, se eliminan parte de los carotenoides, precursores de la vitamina A y otros pigmentos como la clorofila. Posteriormente, con la desodorización se eliminan los malos olores del aceite, pero con este proceso se oxidan los tocoferoles (precursores vitamínicos) y polifenoles, que son importantes antioxidantes. Por lo tanto, se obtiene un aceite bastante más pobre desde el punto de vista nutritivo. Este aceite no se consume directamente, sino que se destina a la mezcla junto con otros aceites de oliva vírgenes hasta conseguir una acidez mínima de un 1%¹⁴. Dicho esto, se puede afirmar que los aceites refinados son menos aconsejables nutricionalmente, no porque sean nocivos sino porque en comparación con los vírgenes son mucho más pobres en cuanto a compuestos beneficiosos para la salud.

2.2 La adulteración del AOVE

El AOVE, por sus numerosos beneficios para la salud, cualidades organolépticas, buena reputación, gran interés y demanda, es el más susceptible a sufrir adulteraciones para incrementar los beneficios económicos, ya que es el más caro del mercado. A demás, en el escenario de la ley de la oferta y la demanda, el precio del AOVE en dicho mercado ha ido subiendo en los últimos años¹⁵.

Existen distintos tipos de fraudes, y algunos de ellos no solo tienen un impacto socioeconómico, sobretodo en zonas donde el olivar constituye un importante pilar de la economía, sino que también pueden llegar a suponer un riesgo para la seguridad alimentaria, porque existen aceites de materias primas, como la soja o los frutos secos, que tienen un conocido potencial alergénico y pueden afectar a la salud del consumidor si se añade fraudulentamente¹⁶. Asimismo, durante el proceso de calentamiento cocinando con aceite adulterado se podrían generar residuos perjudiciales para la salud, ya que cada uno de los componentes se quema y empieza a producir dichos residuos a una temperatura distinta. El fraude no solo tiene repercusiones negativas por todos estos perjuicios, sino que también priva al consumidor de la total obtención de los beneficios del AOVE, ya que al estar adulterado, estos se ven proporcionalmente reducidos.

Se han realizado adulteraciones de todo tipo, pero las más comunes son:

- Adulteraciones por mezcla con otros aceites procedentes de la oliva pero de menor calidad o categoría inferior(aceite de oliva (es decir, refinado), aceite de orujo, vender aceite virgen como virgen extra...etc.).
- Adulteraciones por mezcla con otros aceites de distinta denominación de origen.
- Adulteraciones por adición de otros aceites vegetales refinados que no proceden de la aceituna (aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de soja...etc.).

La normativa vigente prohíbe expresamente la mezcla de aceite de oliva con los de semillas o con cualquier otro aceite o grasa. De ahí la importancia de desarrollar estrategias analíticas sencillas y económicas que permitan determinar posibles adulteraciones¹⁶.

Ha habido casos en que se han detectado adulteraciones hechas de tal manera que los porcentajes de ácidos grasos de las mezclas quedaban perfectamente encuadrados a los que marca la legislación para el aceite de oliva. Uno de estos ha sido el caso de la “Operación Cloroil”¹⁷ en España entre otros casos. En este mismo ejemplo también se detectó que en las mezclas adulteradas se añadían aromatizantes y colorantes como la clorofila para que el producto resultante pareciera realmente

aceite de oliva. Según como se realicen las mezclas, estas pueden parecer tan perfectas que lleguen a confundir a los catadores más expertos.

Puesto que los componentes del aceite de oliva son muy variados y numerosos, los métodos y técnicas analíticas que se emplean para identificarlos y cuantificarlos son también muy diversos.

En los laboratorios dedicados específicamente al análisis del aceite de oliva, como es el caso de los laboratorios de las almazaras, se llevan a cabo diversas determinaciones de rutina con el fin de evaluar la calidad del aceite de oliva así como su pureza. Para ello se emplean métodos oficiales que se encuentran validados¹⁸. Estos se describen brevemente en el siguiente apartado.

2.2.1 Métodos empleados para la autenticación del aceite de oliva

Las determinaciones que normalmente se llevan a cabo para detectar posibles adulteraciones son:

- **La composición de triglicéridos.**
- **Perfil de ácidos grasos y esteroides.**
- **Cuantificación del contenido en ceras:** compuestos presentes en la piel y hojas del olivo, su presencia en cantidades mayores a lo que refleja la ley puede significar adulteración por aceite de orujo o temperaturas muy altas en la elaboración¹⁹.
- **Contenido en alcoholes alifáticos.**
- **Contenido de eritrodiol y uvaol.**
- **Contenido de estigmastadienos:** hidrocarburos que se forman por altas temperaturas y cuya presencia nos remite a la presencia de aceites refinados¹⁹.
- **Contenido de 2-monopalmitato.**
- **Contenido de disolventes halogenados.**

Las metodologías que se emplean para llevar a cabo las determinaciones antes citadas son las siguientes:

- **Cromatografía de gases (GC):** técnica separativa que utilizada para la determinación de la fracción de ácidos grasos y sus derivados, así como la fracción insaponificable, contenido de ácidos grasos totales, ceras, alcoholes alifáticos, tocoferoles, compuestos fenólicos...etc.
- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** técnica utilizada para conocer la estructura de los triglicéridos del aceite de oliva, cantidad de pigmentos como clorofilas y carotenos y otros parámetros de calidad, no de pureza. Se ha propuesto para el análisis de los tocoferoles, ya que el aceite de oliva contiene exclusivamente α -tocoferol, mientras que sus adulteraciones más comunes tienen un patrón determinado¹⁸. Sin embargo, este método presenta importantes limitaciones a causa de la variabilidad natural y diversos problemas analíticos.

Hay otras técnicas analíticas más sofisticadas que se han propuesto para la autenticación de los aceites de oliva, aunque estas no han sido adaptadas por organismos de carácter oficial como son el Consejo Oleícola Internacional o la Comisión del Codex Alimentarius y no son estandarizadas ya que todavía se están investigando y perfeccionando para tal función. Estas técnicas son las siguientes:

- **Espectroscopía infrarroja (IR):** técnica espectroscópica utilizada en diversos estudios para cuantificación rápida y evaluación de la calidad del aceite de oliva. Una de las posibles aplicaciones es la de detección de adulteraciones con aceite de oliva refinado u orujo²⁰.

- **Resonancia magnética nuclear (RMN):** técnica viable para analizar la composición en ácidos grasos, adulteraciones y el grado de instauración. Ésta, además proporciona información sobre componentes minoritarios (esteroles, escualeno, terpenos, compuestos volátiles y otros)²¹.
- **Espectrometría de masas (MS):** técnica no estrictamente espectrométrica ya que no se absorbe ni emite radiación electromagnética, sin embargo, los datos se obtienen de forma espectral. Esta técnica se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa y sirve para determinar la composición en ácidos grasos de diversos aceites vegetales¹⁴.
- **Electroforesis capilar (CE):** técnica separativa basada en la diferencia en la velocidad de migración de distintos solutos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico¹⁴. Se utiliza básicamente para en análisis de los compuestos fenólicos en el aceite de oliva.

Los métodos clásicos que se emplean para la caracterización de los AOVE y detectar adulteraciones como la cromatografía líquida o de gases, tienen el inconveniente de necesitar pasos previos y una preparación exhaustiva de las muestras. Además, este tipo de pruebas también necesitan ser realizadas por personal especializado y entrenado y suelen demorar mucho tiempo hasta obtener los resultados finales. Por último y no menos importante, suelen ser métodos bastante caros²². Con este escenario, se pretenden encontrar nuevas técnicas con igual o mayor eficacia y que sean más sencillas de realizar, más rápidas y económicas que las ya existentes.

3. Hipótesis

El hecho de mezclar aceites de oliva con aceites de otros tipos, hace que se cree una nueva mezcla con una composición totalmente distinta donde se debiesen ver afectadas sus propiedades intrínsecas de esta nueva mezcla en comparación con sus aceites bases, como sus propiedades ópticas, vibracionales, térmicas y acústicas. Esto se debería a la creación de un líquido de composición nueva cuyas características serían propias.

En este trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

- Con alguna de las cuatro técnicas que se plantean en la metodología de este estudio (espectroscopia Raman, Luminiscencia, espectroscopia Brillouin y conductividad térmica mediante el método de tres-omega) se puede llegar a autenticar el aceite de oliva virgen extra de una forma más sencilla, rápida y precisa que con las técnicas ya existentes.

4. Objetivos de la investigación

En el presente trabajo hay un objetivo general y cuatro específicos:

Objetivo general:

- Estudiar la viabilidad de cuatro técnicas distintas para detectar adulteraciones en el aceite de oliva virgen extra; una térmica través de la conductividad y tres ópticas como son la Espectroscopia Raman, la Espectroscopia Brillouin y la Luminiscencia.

Objetivos específicos:

- Detectar cambios en:
 - Las bandas del espectro Raman en las muestras de AOVE adulterado a través de espectroscopia Raman.
 - La intensidad de la luminiscencia y en la posición del pico máximo de intensidad de las muestras de AOVE adulterado.
 - La velocidad del sonido a través de las muestras de AOVE adulterado a través de espectroscopia Brillouin.
 - La conductividad térmica de las muestras de AOVE a distintas temperaturas mediante el método de tres-omega.

5.1 Espectroscopia Raman

Es una técnica fotónica de alta resolución que en pocos segundos proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. Se utiliza en física y química para estudiar modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios, y otros, ya que la información vibracional es muy específica para los enlaces químicos de las moléculas, proporcionando así una huella dactilar de la molécula que puede ser identificada.

La técnica se basa en el análisis de la luz dispersada por un material o compuesto al incidir sobre él un haz de luz monocromático, generalmente de un láser en el rango de luz visible, el infrarrojo cercano, o el rango violeta cercano. Una pequeña porción de esta luz es dispersada inelásticamente[†] experimentando cambios de frecuencia reflejados en distintos picos que son característicos de cada material o componente analizados e independientes de la luz incidente (ver **Figura 5**). Esto es resultado de la interacción de la propia luz del láser con los átomos y moléculas del sistema, que provocan que la energía de los fotones incidentes (la luz del láser) experimente un desplazamiento energético.

Cabe destacar que la mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente, pero una fracción muy pequeña presenta un cambio en su energía debido a la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma energía (o frecuencia) que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh o elástica y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. En cambio, la luz que presenta frecuencias distintas a las de la radiación incidente, es la que sí proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman. De este modo, las nuevas frecuencias (frecuencias Raman) son las características de la estructura poli atómica de dicho material o compuesto y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman.

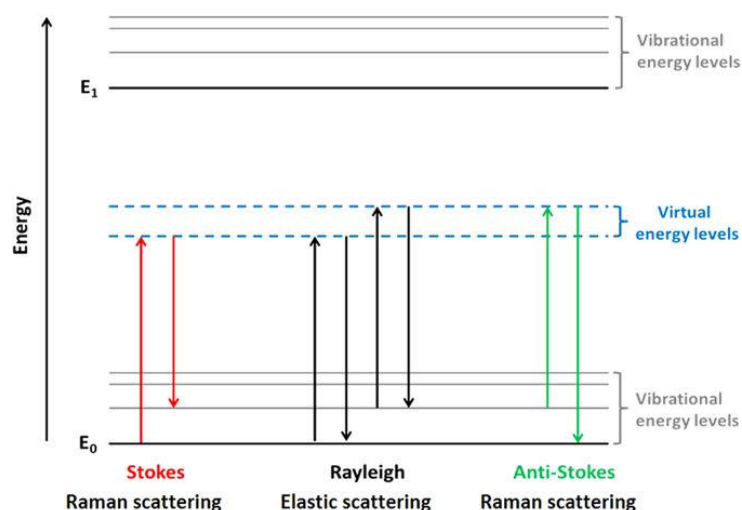


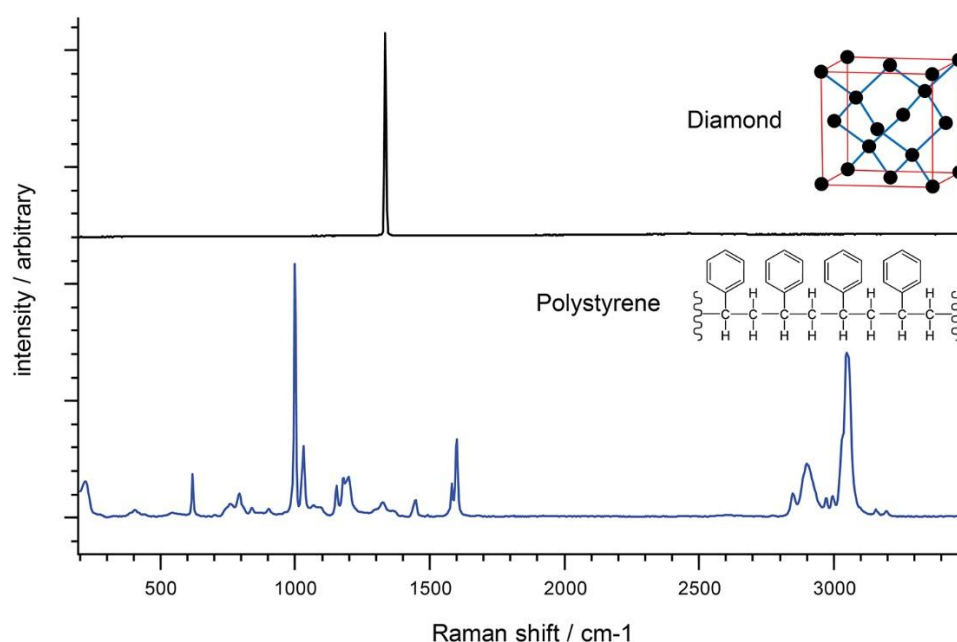
Figura 5. Niveles de energía y las distintas dispersiones en Espectroscopia Raman.²³

[†] Dispersión inelástica: cuando hay un cambio en la frecuencia (energía y longitud de onda) entre el fotón incidente y el emitido.

La espectroscopia Raman es una técnica de caracterización que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar este ningún tipo de preparación especial, y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destructiva. A demás, admite muestras sólidas, líquidas y gaseosas.

Algunas de las aplicaciones de la espectroscopia Raman son la identificación de pigmentos y ligantes en obras de arte²⁴, identificación de diamantes y distintas formas de carbono²⁵ e identificación de componentes en muestras arqueológicas²⁵. También se usa en medicina para el seguimiento en tiempo real de las mezclas de gases respiratorios y la anestesia durante la cirugía.²⁵

La espectroscopia Raman tiene el potencial de poder utilizarse en la medida de los distintos tipos de aceites y establecer la pureza de estos²⁶.



*Figura 6. Ejemplos de espectros Raman de diamante (banda única) y poliestireno (bandas múltiples)*²⁷.

En este trabajo, se midieron cinco aceites distintos, cuatro de ellos puros (aceite de oliva virgen extra, aceite de orujo, aceite de girasol alto oleico y aceite de maíz) y una mezcla de aceite de soja y nuez. Los espectros fueron medidos utilizando un espectrómetro Raman fabricado por Horiba Jobin Yvon. Estos fueron registrados en la región espectral 1000-1700 cm^{-1} (ver **Figura 10** del apartado “Resultados”). Se utilizó en el modo de grilla única de 2400 líneas con una resolución espectral $< 0.4 \text{ cm}^{-1}$. Los aceites fueron medidos dentro de una cubeta de cuarzo, la misma utilizada para las medidas de Brillouin y luminiscencia (ver **Figura 7**). Todas las medidas de Raman fueron hechas utilizando un Laser de diodo verde de longitud de onda $\lambda = 532 \text{ nm}$ con un objetivo de microscopio de larga distancia focal y de 50x de aumento. La potencia del Laser se mantuvo lo más baja posible ($\sim 1 \text{ mW}$) para evitar cualquier efecto de auto calentamiento y para evitar la degradación de las especies.

5.2 Luminiscencia

La luminiscencia es un proceso no térmico de emisión de fotones que ocurre en un material después de absorber algún tipo de energía proveniente de la luz (fotones), de una corriente eléctrica (electrones), radiación de rayos X, reacciones químicas, etc. La emisión luminiscente ocurre como resultado de una transición electrónica relativa, en la cual, un electrón pasa de un nivel de energía mayor a uno más bajo. La diferencia de energía es emitida en forma de un fotón y la longitud de onda de la luz emitida es característica de cada material²⁸. Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su alta sensibilidad.

Existen compuestos presentes en el aceite de oliva virgen que poseen propiedades luminiscentes. Los principales compuestos fluorescentes[‡] presentes son tocoferoles, pigmentos (clorofilas, carotenos y derivados), fenoles y vitamina E.²⁹

Bajo la inspiración del trabajo de Kyriakidis et al.³⁰ quienes estudian la fluorescencia en distintos aceites, incluyendo el aceite de oliva, en esta investigación se propone el uso de la luminiscencia como un indicador de la adulteración en aceite de oliva.

Para la medición de la luminiscencia se utilizaron las muestras de AOVE puro y del mismo adulterado con aceite de girasol, aceite de girasol alto oleico, aceite de maíz y mezcla de aceite de soja y nuez a concentraciones de 5,10,20 y 50% vol. Se utilizó un láser de diodo verde a una longitud de onda de 532 nm. Similarmente como se muestra en la **Figura 7**, la medidas fueron hechas utilizando un objetivo de microscopio de 10X de aumento y utilizando un espectrómetro fabricado por Horiba Jobin Yvon. Se utilizó en el modo de grilla única de 300 líneas con una resolución espectral ≤ 1 nm. Los aceites fueron medidos dentro de una cubeta de cuarzo, la misma utilizada para las medidas de Brillouin y Raman. La potencia del Laser se mantuvo lo más baja posible (~ 1 mW) para evitar la degradación de las especies. Todas las medidas se realizaron una sola vez.

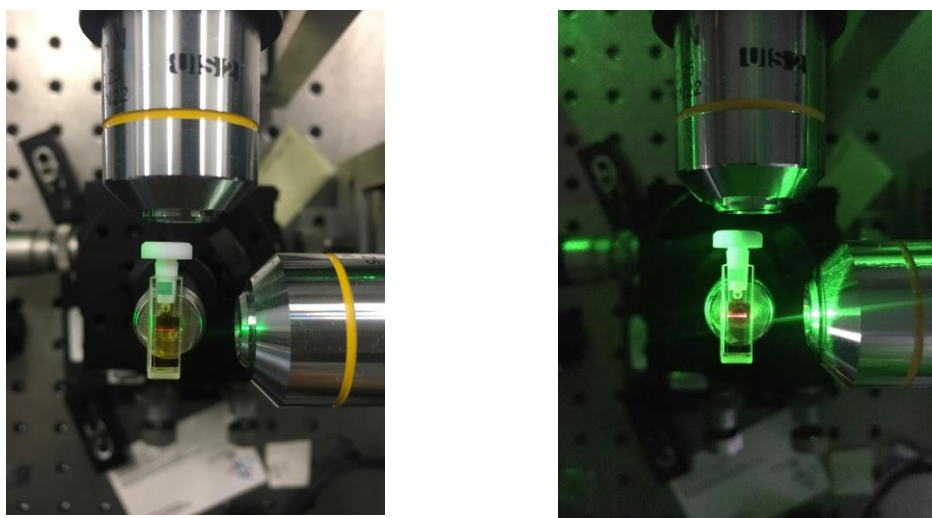


Figura 7. Cambio de color de la luz del láser verde al atravesar la muestra de aceite de oliva debido a su luminiscencia.

[‡]Fluorescente: luminiscencia debida a la excitación de una sustancia que absorbe radiaciones, y que cesa al desaparecer dicha excitación⁴⁴.

5.3 Espectroscopia Brillouin

La Espectroscopia Brillouin es una técnica espectroscópica que permite conocer la velocidad de propagación de las ondas de sonido a través de un material, las cuales aportan información acerca de la dureza, viscosidad y densidad de un compuesto.

La velocidad del sonido se refiere a la velocidad que con que las vibraciones propias del material (vibraciones atómicas o moleculares) se “desplazan” a través del medio. Estas vibraciones son de muy baja energía que al “desplazarse” producen variaciones locales de la densidad en el medio y, que para el caso del aire, se presentan como sonidos audibles. Una de la formas de obtener la velocidad de propagación de las ondas acústicas se conoce como Espectroscopia Brillouin, en honor a uno de los primeros científicos que postularon la existencia de tal fenómeno, el francés Léon Brillouin en 1922³¹.

Al igual que Raman, la espectroscopia de Brillouin detecta pequeñas variaciones de la energía de un haz de luz incidente sobre un medio. Estas variaciones se deben a la interacción inelástica de la luz con los fonones acústicos poblados térmicamente del sistema a medir. Las velocidades del sonido se determinan a través de la siguiente ecuación:

$$f = \frac{v_s}{\lambda_s} = \frac{2nv_s}{\lambda_0}, \quad (1)$$

Donde f , λ_s y v_s es la frecuencia (la variación de energía que detecta el espectrómetro de Brillouin), la longitud de onda y la velocidad del fonon acústico detectado, n es el índice de refracción del medio y λ_0 (532 nm) es la longitud de onda del haz de luz de excitación.

Para la medición de la velocidad del sonido se utilizaron las muestras de AOVE puro y las muestras del mismo adulterado con aceite de girasol alto oleico (50% vol), aceite de soja y nuez (20 y 50% vol), aceite de orujo (50% vol) y aceite de maíz (20 y 50% vol). Los espectros de Brillouin fueron medidos utilizando un interferómetro JRS Tamdem Fabry-Pérot TFP-1, utilizando la misma cuvette y configuración señalada en la **Figura 7**.

5.4 Conductividad térmica y método de tres-omega

La conductividad térmica (k) es una propiedad física de los materiales, ya sean sólidos líquidos o gaseosos, y hace referencia a la capacidad que un sistema puede conducir el calor. k se define como la razón entre el flujo térmico (Q) y el gradiente de temperatura que to produce (ΔT), $k = Q/\Delta T$.

Dentro de los métodos de medición de propiedades térmica de líquidos podemos nombrar: “alambre caliente transitorio” (transient hot-wire), espectroscopia de correlación fotonica, laser flash y tres-omega (3ω)³²⁻³³. En este trabajo hemos utilizado en una versión modificada del 3ω basada en los trabajos de Chen et al.³⁴, Oh et al.³⁵ and Lubner et al.³⁶. La ventaja de este método sobre los antes mencionados es que se trata de una medida muy rápida, por lo cual la contribución de la convección es totalmente despreciable. Las celdas para la medición de las conductividades térmicas se muestran en la **Figura 8**. Estas celdas consisten en substratos de cuarzo a las cuales se les deposita un pequeño resistor de oro-cromo de 100 nm de grosor, 1 mm de largo y 10 μm de ancho ($2b$), el cual se ha pasivado eléctricamente depositando 200 nm de óxido de silicio (SiO_x). Posteriormente, un bloque PDMS[§] de 3mm de grosor es usado como contenedor del líquido tal como se muestra en la **Figura 8**.

A continuación se muestran dos figuras; la (a) es un esquema de una celda tres-omega³⁷ y su funcionamiento (b) expresado en términos de la corriente oscilante, el calor producido (dependencia al segundo armónico, 2ω), el aumento de la temperatura (ΔT o θ en la figura), la dependencia lineal de la resistencia eléctrica con la temperatura ($R \sim \theta$) y finalmente su relación el tercer armónico del voltaje. Adaptada de C. Dames³⁸.

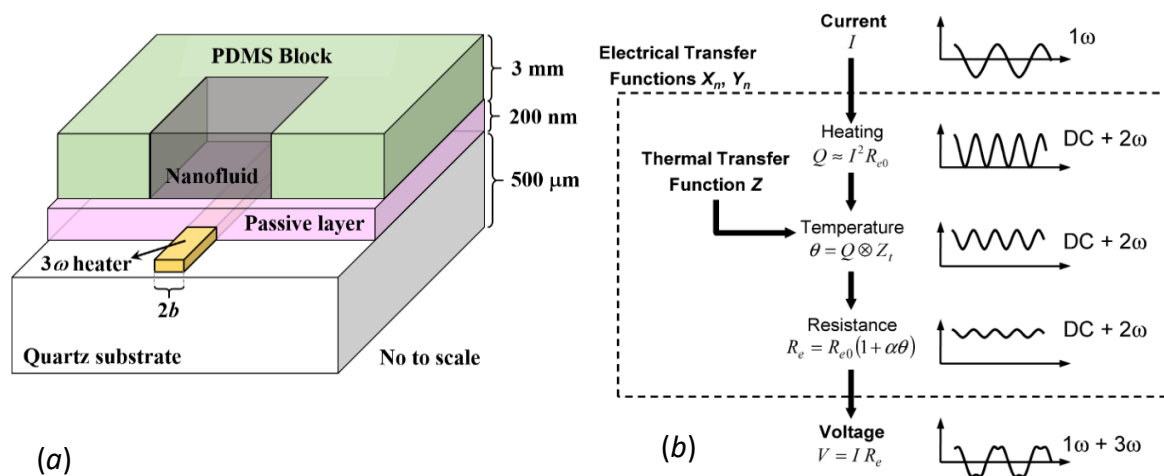


Figura 8. (a) Esquema de una celda de tres-omega y su funcionamiento. (b) Esquema del funcionamiento del método tres-omega adaptado de C. Dames³⁸.

Estas medidas consisten en pasar una corriente oscilante (AC) por un pequeño resistor metálico (oro-cromo en nuestro caso), el cual está en contacto directo con el líquido a medir. Este resistor actúa tanto de “calefactor” local y termómetro. La señal AC con una frecuencia angular ω ($\omega = 2\pi f$,

[§] PDMS o polidimetilsiloxano es un polímero orgánico perteneciente a la familia de las siliconas.

donde f es la frecuencia) fluye a través del resistor genera un aumento de local del calor por efecto de Joule que oscila a 2ω . Finalmente este calor genera un aumento de temperatura, ΔT , que depende de las conductividades térmicas del sistema. Debido a que la resistencia eléctrica de la línea metálica está linealmente relacionada con la temperatura (ver Error! Reference source not found.b), el DT puede obtenerse directamente de esta dependencia. Las oscilaciones en temperatura se obtienen de la tercera armónico de voltaje a través de:

$$\Delta T = \frac{2U_{3\omega}}{\alpha U_0} \approx 2 \frac{U_{3\omega,rms}}{\alpha U_{\omega,rms}} \quad (2)$$

Donde U_0 es la amplitud del voltaje que incluye todas las componentes armónicas, U_ω y $U_{3\omega}$ son la primera y tercera componente armónica del voltaje, α es el coeficiente de temperatura del resistor metálico. Debido a que U_ω es al menos tres órdenes de magnitud más grande que $U_{3\omega}$, se puede aproximar U_0 con U_ω . Finalmente, la conductividad térmica de las muestras se obtiene midiendo la dependencia en frecuencia del $U_{3\omega}$. En este trabajo la señal de 3w fue medida utilizando un lock-in amplifier (7260 DSP, EG&G Instruments) utilizando un circuito similar a un puente de Wheatstone.

La conductividad térmica del sustrato de una celda vacía de cuarzo puede obtenerse por medio de la resolución de la ecuación transitoria de Fourier considerando un alambre de ancho finito (2b) y de extensión infinita depositado sobre un plano semi-infinito dado por³⁹⁻³³:

$$\Delta T = \frac{P_l}{k\pi} \int_0^\infty \frac{\sin^2(xb)}{(xb)^2 \sqrt{x^2 + q^2}} dx = \frac{P_l}{k\pi} F(qb) \quad (3)$$

Donde $q \equiv 1/\lambda = \sqrt{2i\omega/D}$ es inverso de la profundidad de penetración térmica (λ) D y k son la difusividad y conductividad térmica del sustrato, respectivamente, y P_l es la potencia AC por unidad de longitud, es decir, P/l donde l es la longitud del resistor.

Conductividad térmica de fluidos

Para determinar la conductividad térmica de los fluidos, el resistor eléctrico es considerado como una fuente de calor localizada justo en medio de dos sistemas semi-infinitos: S (para el sustrato) y F (para el fluido). Entonces, asumiendo que la transferencia de calor solo ocurre en dicha interface (F-resistor-S), el incremento total de temperatura medida por el resistor (ΔT_{total}) puede ser expresada como:

$$\frac{1}{\Delta T_{total}} = \frac{1}{\Delta T_S} + \frac{1}{\Delta T_F} \quad (4)$$

Donde ΔT_S y ΔT_F son los incrementos en temperatura de un sustrato vacío y del fluido solo, respectivamente. Finalmente, la conductividad térmica del fluido puede ser estimada resolviendo la ecuación (3) por medio de un ajuste de mínimos cuadrados.

La medición de la conductividad térmica se realizó en las muestras de AOVE puro y del mismo adulterado con mezcla de aceite de soja y nuez (10 y 50% vol) y con aceite de maíz (50% vol). También se realizó en las muestras de cuatro aceites adulterantes puros (aceite de orujo, aceite de girasol, aceite de maíz y mezcla de aceite de soja y nuez). Todas las mediciones se realizaron una vez.

No se empleó el bloque PDMS en ninguna de las mediciones ya que todas las muestras de aceite tenían la suficiente densidad como para no esparcirse por la celda, al contrario de otros fluidos donde sí es necesario utilizar este bloque.

En la **Figura 9** se muestra a través de la lupa la celda de tres-omega con la que se realizaron las mediciones de este estudio. En el centro de la celda se ve la gota de aceite a través de la cual pasaba la corriente eléctrica.

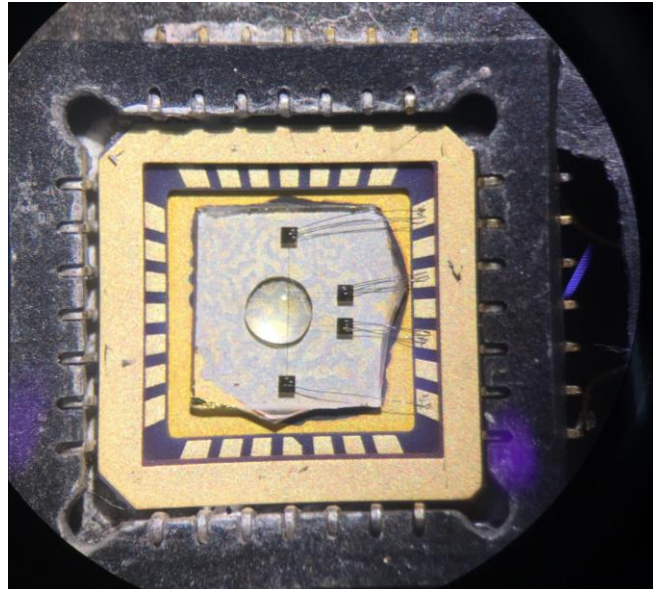


Figura 9. Celda de tres-omega y muestra de aceite.

6. Resultados y discusión

6.1 Espectroscopia Raman

En la **Figura 10** Se muestran los espectros Raman del AOVE "Salvatge" y de las otras tres muestras de aceites puros (aceite de orujo, aceite de girasol alto oleico, aceite de maíz y mezcla de aceite de soja y nuez).

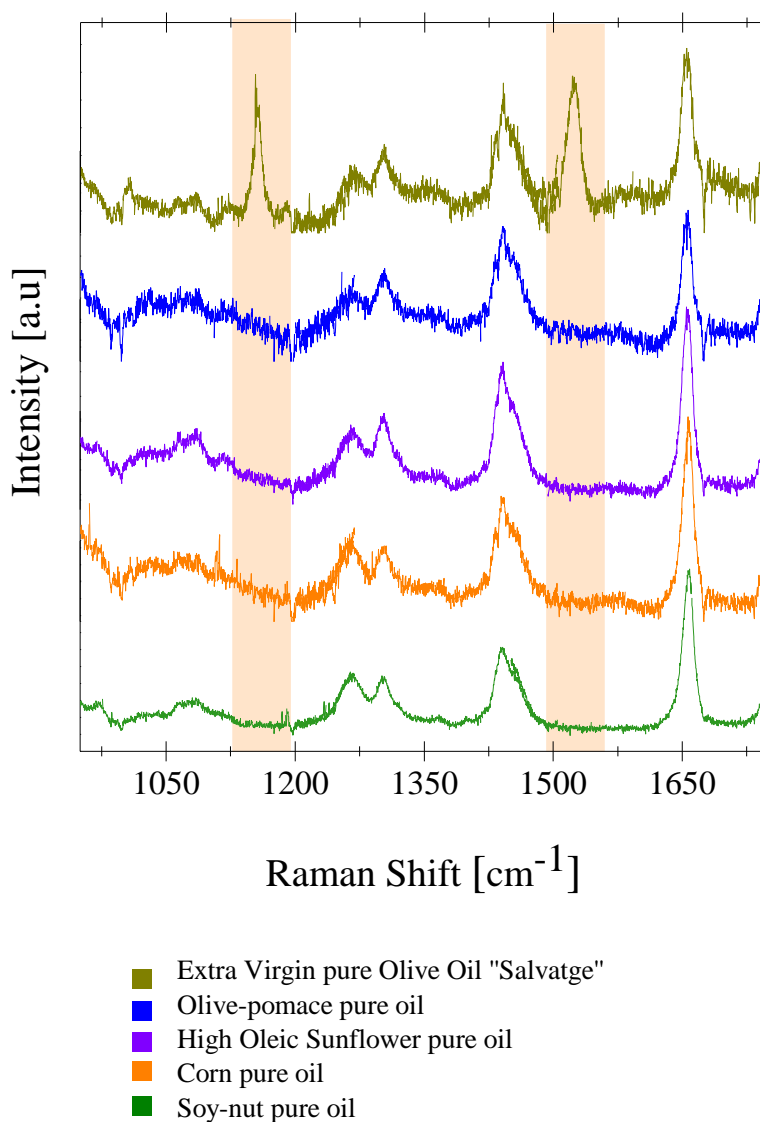


Figura 10. Espectros Raman del aceite de Oliva Virgen Extra "Salvatge" y otros tres aceites puros distintos no adulterados. Los rectángulos naranjas resaltan modos vibracionales solo hallados en el AOVE..

Mientras que los diferentes espectros de aceite exhiben cambios en las intensidades Raman de muchas líneas, no hay cambios notables en las posiciones de estas bandas. Sin embargo, existen bandas únicas del AOVE alrededor de 1150 y 1525 cm^{-1} . Dichas bandas solo fueron halladas en el AOVE y no en las otras muestras de aceite, y son las marcadas con rectángulos naranjas para su mejor visualización.

Según un estudio realizado por R.M. El-Abassy et al. en 2009, estas dos bandas son atribuidas a los carotenoides²². El hecho de que el aceite de oliva virgen extra sea el único que presente estas bandas, se puede relacionar con la ausencia de un proceso de refinado, en el cual los carotenoides se eliminan durante la etapa de decoloración. Por esta razón, los otros cuatro aceites (aceite de orujo, aceite de girasol o de oleico, aceite de maíz y aceite de soja y nuez) no presentan dichas bandas, ya que estos sí han sufrido un proceso de refinado donde han podido desaparecer los carotenoides.

A continuación, en la **Figura 11** se muestra el espectro Raman del mismo aceite de oliva virgen extra junto con el de muestras de este aceite adulterado con aceite de orujo al 10 y 50 % en volumen.

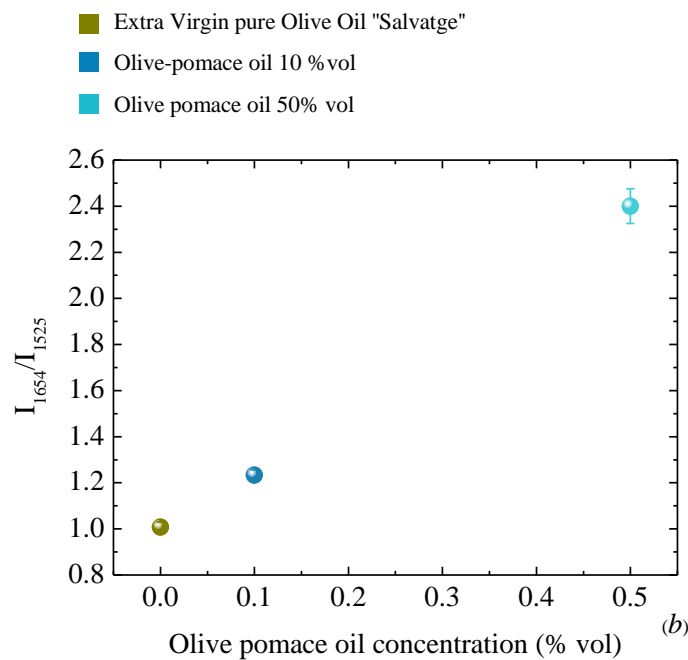
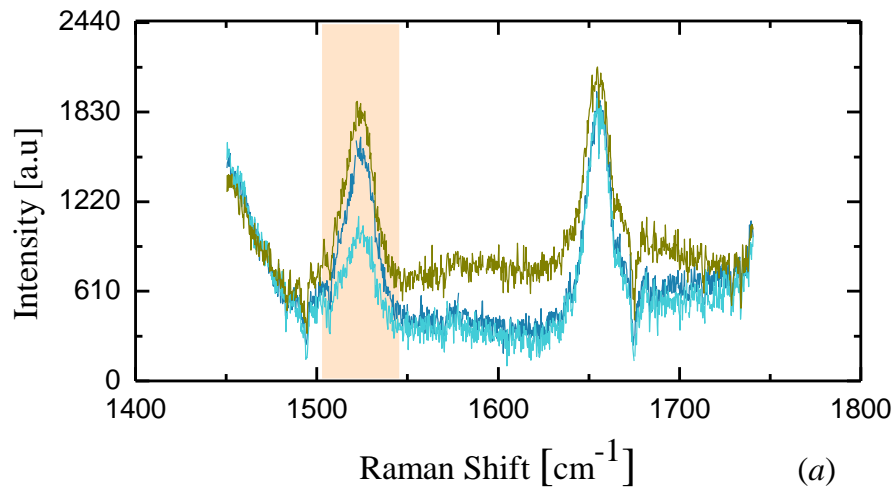


Figura 11. (a) Espectro Raman del aceite de oliva virgen extra puro y del mismo adulterado con aceite de orujo de oliva a distintas concentraciones. (b) Cociente entre los dos picos de intensidad que aparecen en (a).

Como se puede observar, la banda a 1525 cm^{-1} aparece en los dos aceites adulterados y la intensidad de ésta va descendiendo a medida que la concentración de aceite adulterante aumenta. Este cambio en la intensidad es debido a la combinación de los dos espectros, y se demuestra mediante la razón de intensidades I_{1654}/I_{1525} como se puede observar en el segundo gráfico de la **Figura 11**.

Se ha escogido la banda de 1525 cm^{-1} y no la de 1150 cm^{-1} para así poder calcular el cociente con el siguiente pico máximo de intensidad que aparecía, ya que éste estaba más cerca y caía en la misma ventana espectral, es decir, el de 1654 cm^{-1} .

En el estudio de M. Zou, X. Zhang, X.Qi et al.⁴⁰ no aparecen las bandas a 1150 y 1525 cm^{-1} pertenecientes a los carotenoides en los resultados. Puede ser porque el espectrofotómetro Raman que utilizan tenga menor sensibilidad que el empleado en este estudio. Lo que se compara en el otro estudio es la banda a 1657 cm^{-1} que pertenece a los ácidos grasos poliinsaturados, donde se observa cómo la intensidad de esta banda en el aceite de oliva es menor en comparación a los otros aceites vegetales que estudia. Esto es debido a que el aceite de oliva contiene menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que los otros aceites. En nuestro estudio también hubiese sido interesante estudiar las diferencias de intensidades en esta banda, que también aparece en el espectro.

En el estudio de R.M. El-Abassy et al.²² sí aparecen las bandas pertenecientes a los carotenoides y también se observa una aparente disminución de intensidad en las muestras adulteradas en comparación a las de AOVE puro.

Por lo tanto, según nuestro estudio, pequeñas variaciones de intensidad en esta banda de 1525 cm^{-1} pueden ayudar a detectar adulteraciones en el aceite de oliva virgen extra, siempre y cuando se calcule la razón con el siguiente pico máximo de intensidad, ya que no se pueden comparar intensidades entre dos picos de manera aislada. Sería preciso establecer unos parámetros de intensidad en la banda de 1525 cm^{-1} perteneciente a los carotenoides para los aceites de oliva virgen extra. Podríamos decir que mediante espectroscopia Raman es posible detectar adulteraciones en el AOVE con aceites refinados. Existen espectrofotómetros Raman portátiles, cosa que facilitaría las medidas in-situ para saber en cualquier lugar la genuinidad de una muestra de aceite.

6.2 Luminiscencia

En la **Figura 12** se presentan los resultados de luminiscencia de los aceites adulterados a diferentes concentraciones y del aceite de oliva virgen extra.

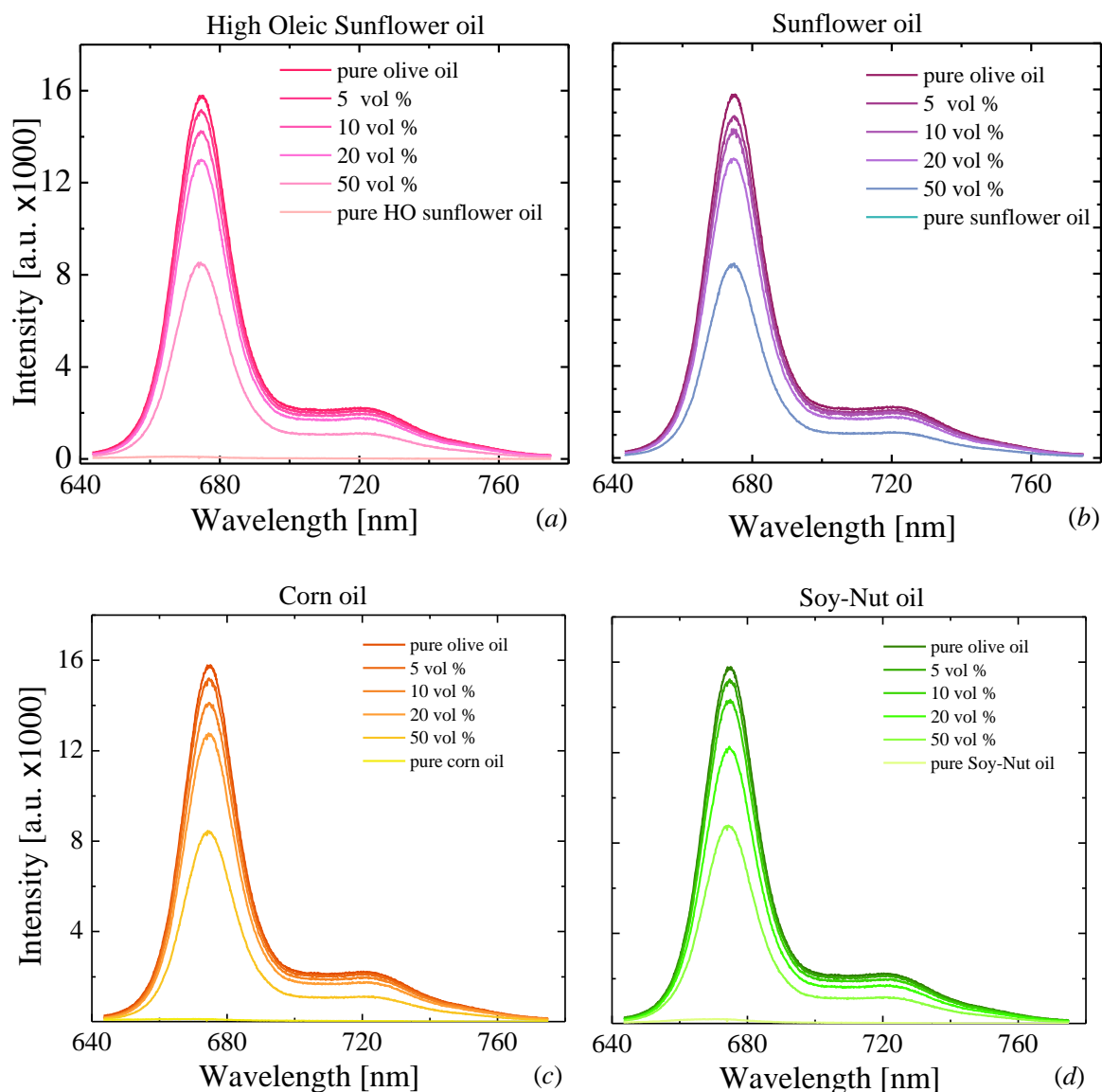


Figura 12. Espectro de fluorescencia del aceite de oliva virgen extra adulterado con distintas concentraciones de aceite de girasol alto oleico (a), aceite de girasol (b), aceite de maíz (c) y con una mezcla de aceite de soja y nuez (d).

Como se puede observar en la **Figura 12**, en todos los casos la intensidad de la luminiscencia va descendiendo a medida que aumenta la concentración de aceite adulterante. Del mismo modo, se observa también como la intensidad de cada aceite adulterante puro es casi inapreciable, es decir, prácticamente cero. Esto puede ser debido a la baja concentración de compuestos que poseen propiedades luminiscentes como pigmentos (clorofila, carotenos y derivados), fenoles y vitamina E presente en dichos aceites adulterantes. Aunque no es el caso de la vitamina E, ya que su concentración es mayor en el aceite de girasol que en aceite de oliva virgen extra.

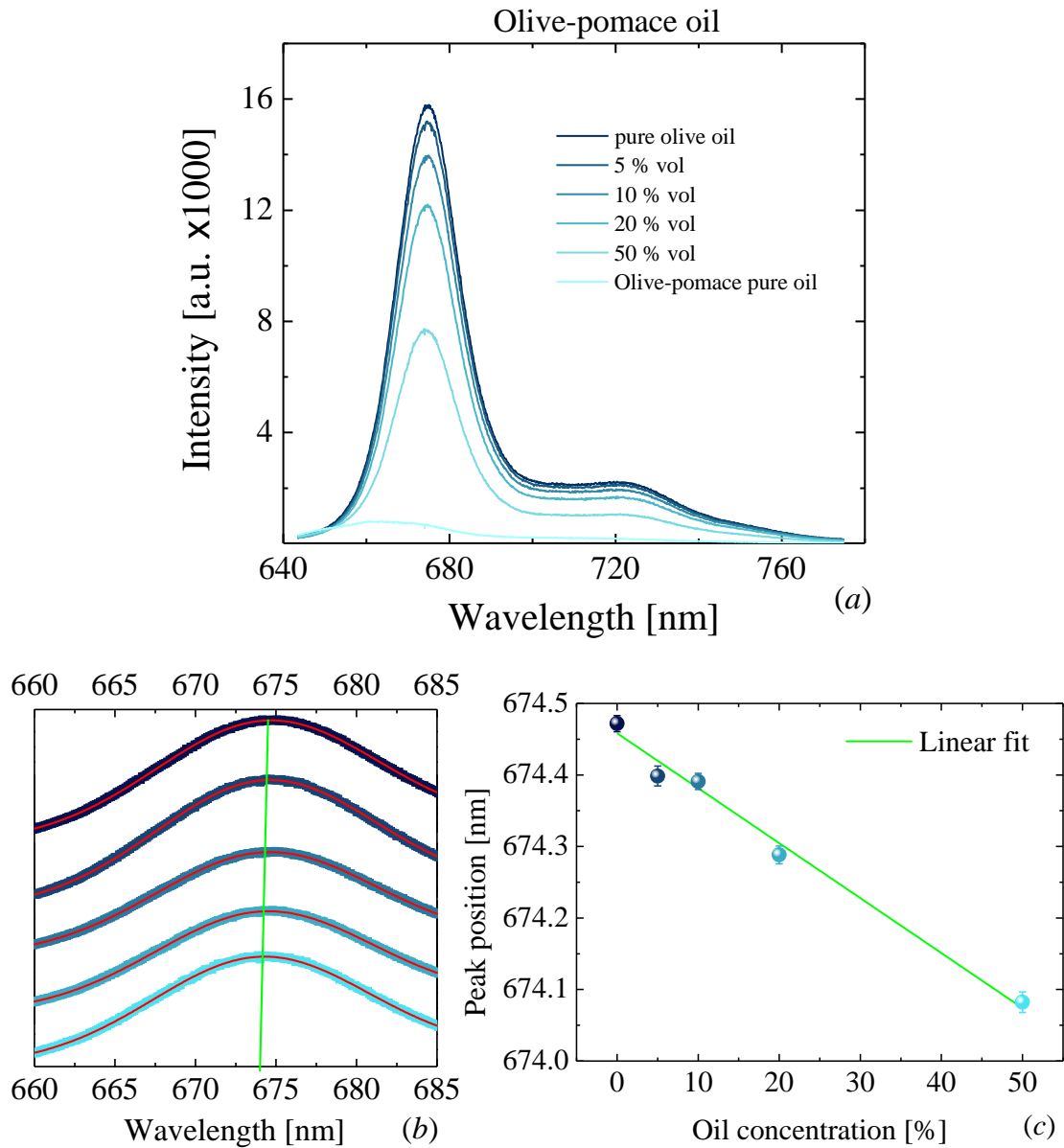


Figura 13. (a) Espectro de fluorescencia del aceite de oliva virgen extra adulterado con distintas concentraciones de aceite de orujo de oliva. (b) Ampliación de los distintos máximos de intensidad (puntos) y sus respectivos ajustes (líneas rojas). (c) Posición de los máximos de intensidad según la concentración de orujo adulterante.

En el caso de la adulteración con el aceite de orujo de oliva, también se puede observar en la **Figura 13** el mismo efecto en el descenso de la intensidad en la luminiscencia (a). En el gráfico (b) y (c) de la misma figura, se ve como el pico máximo de intensidad va desplazándose hacia la izquierda a medida que aumenta la concentración de aceite de orujo de oliva. Esto es debido a la combinación de los espectros de los dos aceites, ya que el pico máximo de intensidad en el aceite de orujo puro está muy desplazado hacia la izquierda, como se observa en (a).

A continuación se muestran los resultados de luminiscencia de las muestras de aceites de oliva virgen extra y aceite de oliva.

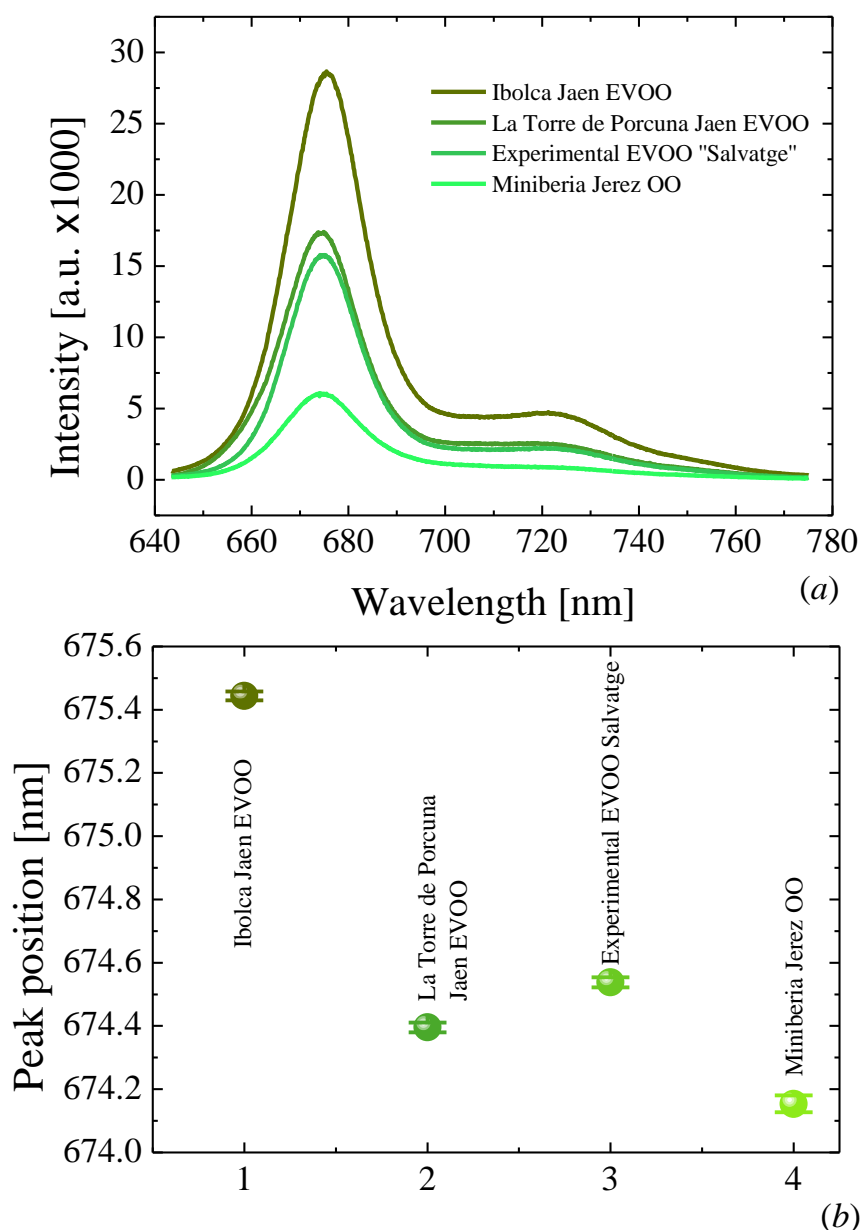


Figura 14. (a) Espectro de fluorescencia de distintos tipos de aceite de oliva virgen extra (Ibolca y La Torre de Porcuna), el aceite de oliva virgen extra utilizado para la preparación de todas las muestras adulteradas (Salvatge) y de un aceite de oliva (Miniberia). (b) Posición de los máximos de intensidad de los distintos tipos de aceites. EVOO: Extra Virgin Olive Oil / OO: Olive Oil

En la **Figura 14** (a) se observa que el aceite más luminiscente es el aceite de oliva virgen extra "Ibolca" de Jaén. El que tiene una intensidad menor de los cuatro es el aceite de oliva Miniberia, que contiene exclusivamente aceites de oliva refinados. Esto puede ser debido a lo explicado anteriormente en el efecto del proceso de refinado; Cuando un aceite se refina, pierde parte de los compuestos que poseen propiedades luminiscentes. He aquí que la luminiscencia del aceite de oliva

refinado sea menor que la del aceite de oliva virgen extra, el cual mantiene sus características nutricionales y organolépticas originales.

En el gráfico (b) de la misma figura también se puede apreciar que el máximo de luminiscencia de cada aceite de oliva puro tiene su propia posición. Esto quiere decir que para que se pudiesen detectar adulteraciones mediante la determinación del desplazamiento del pico de intensidad como se muestra en los gráficos (b) y (c) de la **Figura 13**, habría que saber la posición del pico máximo de intensidad del aceite de oliva puro original que se estuviese midiendo.

Esto es debido a que cada aceite está extraído de una variedad distinta de aceituna, y por eso no todas las aceitunas tienen exactamente la misma composición nutricional. Ésta depende de otros factores además de la variedad como el año de cosecha, la denominación de origen, el grado de maduración, o las condiciones agroclimáticas⁴¹.

Viendo los resultados se podría decir que el desplazamiento del pico de intensidad en luminiscencia podría contribuir a la detección de pequeñas adulteraciones en aceite de oliva virgen extra, siempre y cuando se comparare con el aceite puro original, sabiendo que ese está muestreado directamente de la almazara** antes de ser posiblemente mezclado y embotellado.

Este método podría ser utilizado junto a la espectrometría Raman para detectar adulteraciones en el AOVE con aceites refinados ya que como se ha mencionado anteriormente, tanto los carotenoides como los compuestos luminiscentes presentes en el AOVE disminuyen o prácticamente desaparecen con el proceso de refinado.

Tanto la luminiscencia como Raman, se pueden medir a través del mismo equipo, lo cual es una gran ventaja. Todo esto podría ser una buena contribución a la seguridad alimentaria ya que se detectarían adulteraciones con aceites potencialmente alérgenos, además de las repercusiones que conlleva desde el punto de vista nutritivo y bromatológico.

6.3 Espectroscopia Brillouin

Los resultados obtenidos en las mediciones de la velocidad del sonido fueron los de la **Figura 15** que se muestran a continuación:

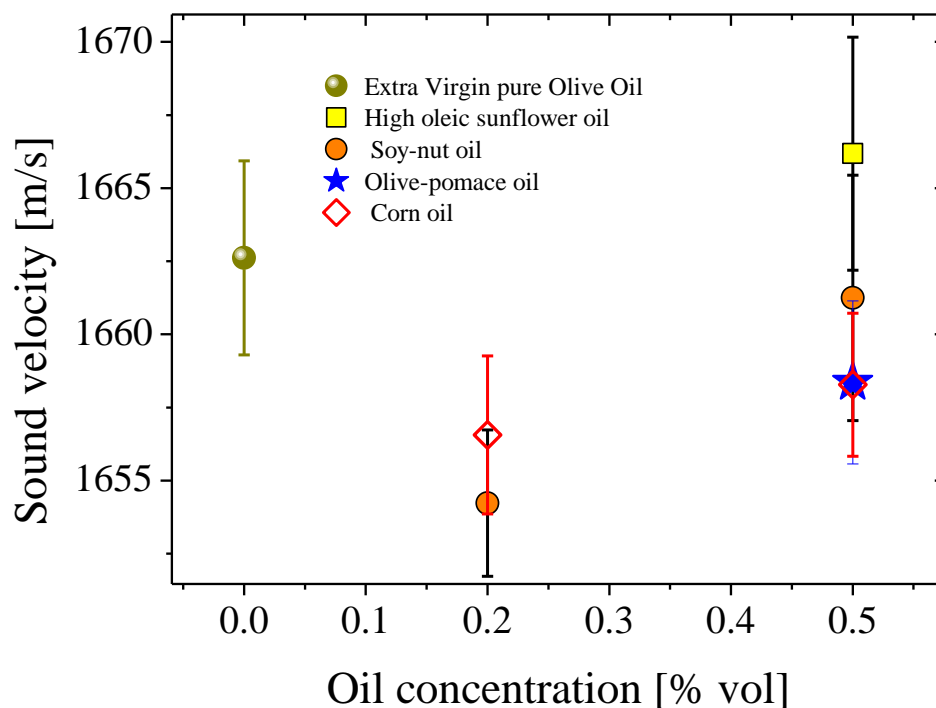


Figura 15. Posiciones de los picos máximos de velocidad del sonido del aceite de oliva virgen extra puro y adulterado con otros aceites a distintas concentraciones.

Como se observa en la **Figura 15**, las velocidades del sonido de los aceites adulterados son muy parecidas a las del aceite de oliva virgen extra puro. Algunas están por debajo y alguna por arriba, como es el caso del AOVE adulterado con aceite de girasol alto oleico, por lo tanto, estas diferencias no son significativas ya que no se puede discernir. Esto quiere decir que si tuviésemos una muestra “problema” para analizar, no podríamos ser capaces de afirmar con certeza que ese aceite fuese puro o estuviese adulterado. Dicho esto, la Espectroscopia Brillouin no sería un buen método para la autenticación de aceite de oliva.

6.4 Conductividad térmica

Para ver diferencias en la conductividad térmica se midieron en este caso diez muestras de aceite y los resultados fueron estos:

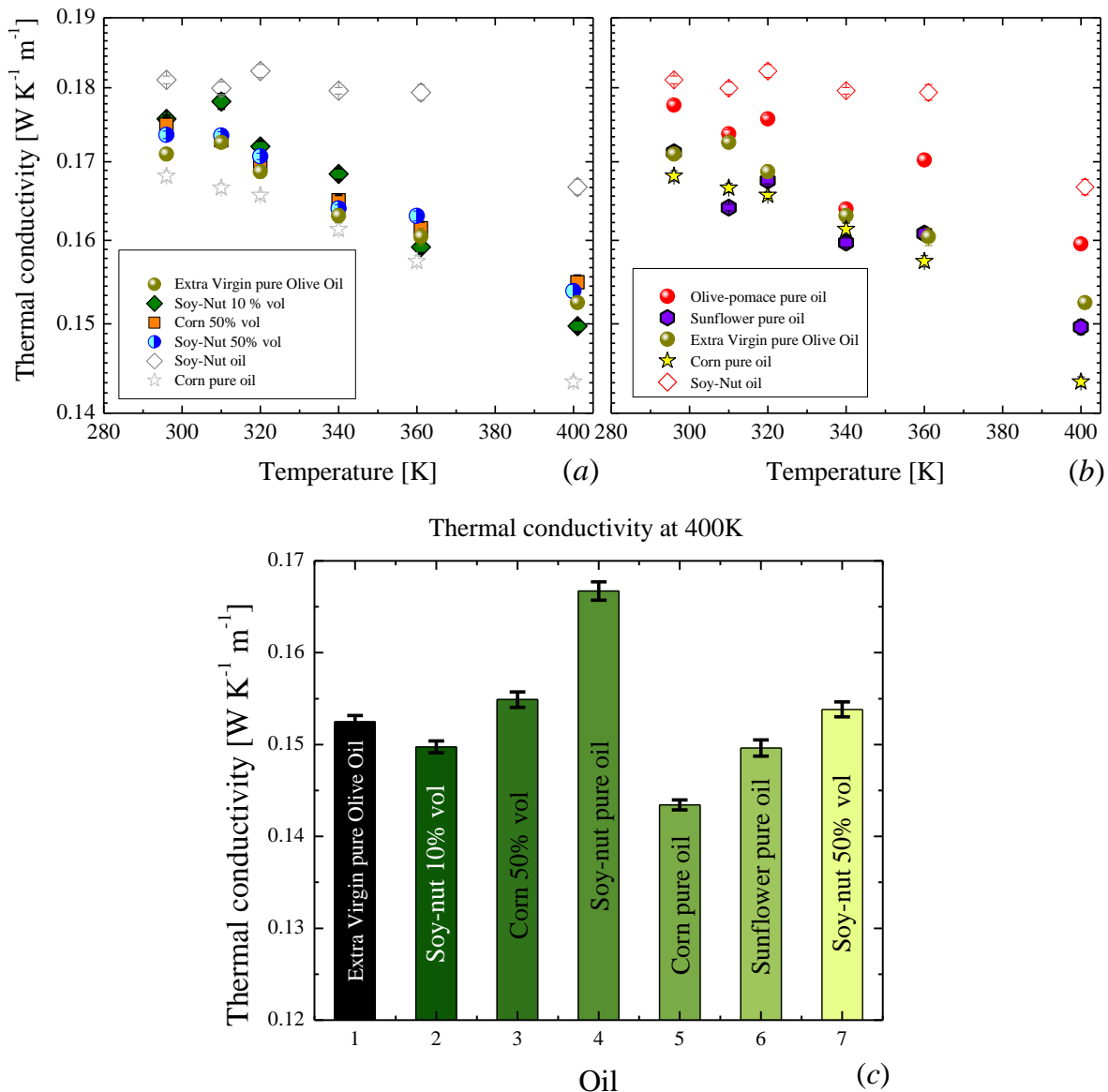


Figura 16. (a) Conductividad térmica del aceite de oliva virgen extra puro y adulterado con otros aceites a distintas concentraciones. (b) Conductividad térmica del aceite de oliva virgen extra y otros aceites puros. (c) Conductividad térmica de los aceites a 400 K.

En el gráfico (b) de la **Figura 16** se ve como la conductividad del aceite de oliva virgen extra es muy parecida a la del aceite de girasol y al de maíz. Solo hay pequeñas diferencias con el aceite de soja y nuez y con el aceite de orujo a altas temperaturas. El hecho que la conductividad térmica sea muy parecida entre estos aceites puros, hace que cuando el AOVE esté adulterado con los mismos aunque sea a altas proporciones, la diferencia de conductividad sea todavía menor y muy poco apreciable, como se muestra en el gráfico (a) de la misma figura. Después de estos resultados no se continuó midiendo más muestras de aceites debido a la poca diferencia en conductividades térmicas de los aceites adulterados.

A pesar de que se concluye que no es un buen método para la autenticación del AOVE, con este estudio se obtuvieron resultados de conductividad térmica medidos con un método mucho más preciso y sensible comparado con el que se utiliza en el estudio de A. Turgut et al.⁴² para medir la conductividad de los aceites.

Aunque la conductividad térmica no sirva para la autenticación del AOVE, es una propiedad importante para comprender los procesos de transporte durante el procesamiento de los alimentos como el calentamiento, la refrigeración, el freído...etc⁴². Por lo tanto, conocer esta propiedad de distintos aceites vegetales puede ser interesante para otras aplicaciones en la industria alimentaria.

Es importante seguir investigando en métodos de detección de adulteraciones en el aceite de oliva que consigan una mayor eficacia y eficiencia que los actuales, ya que es un problema de salud pública y el deber es proteger siempre a los consumidores.

7. Conclusiones

- Conclusión general:

En este trabajo se ha demostrado que la velocidad del sonido mediante la espectroscopia Brillouin y la conductividad térmica mediante el método de tres-omega no son técnicas adecuadas para la autenticación del aceite de oliva virgen extra debido a las inapreciables diferencias entre los resultados. Por otra parte, se ha visto que la espectroscopia Raman y a luminiscencia pueden ser utilizados como métodos no destructivos, útiles, fáciles y rápidos para la detección de adulteraciones en el AOVE, teniendo la ventaja de no requerir previa preparación de las muestras.

- Conclusiones específicas:

- Sí hay cambios en distintas bandas del espectro Raman entre las muestras de AOVE puro y las muestras del mismo adulteradas con otros aceites vegetales.
- Es posible detectar cambios de intensidad y desplazamiento entre las distintas muestras de aceite adulterado y las muestras de AOVE puro.
- No hay cambios significativos en la velocidad del sonido entre las muestras de aceite adulteradas y las no adulteradas.
- No hay cambios significativos en la conductividad térmica entre las muestras de aceite adulteradas y las no adulteradas.

8. Trabajo futuro

Siendo la clorofila un compuesto del aceite de oliva virgen extra con propiedades luminiscentes, para las medidas de luminiscencia podría ser interesante añadirla en las distintas muestras de aceite adulterado para ver qué pasaría con la intensidad de la luminiscencia (si ésta bajaría o bien se mantendría igual). Como se ha nombrado anteriormente, en algunos casos de adulteración del aceite de oliva se descubrió que se le añadía clorofila a la mezcla final para tener una apariencia visual mucho más similar a la del aceite de oliva virgen extra puro, ya que con el proceso de refinado, la clorofila se transforma en compuestos más estables como la feofitina⁴³, que es mas amarilla. De ahí que resulte un aceite de color dorado en lugar de verdoso, color característico de algunos aceites de oliva virgen extra.

9. Agradecimientos

En el presente trabajo quisiera agradecer en primer lugar a la Prof. Dr. Clivia Sotomayor Torres, líder del grupo “Photonic and Phononic Nanostructure Group” del cual formé parte por habernos permitido realizar esta investigación, ya que sin su aprobación no hubiese sido posible. En segundo lugar al Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) por habernos prestado las instalaciones y todos los equipos necesarios para llevar a cabo dicha investigación. En tercer lugar, agradecer al Dr. Emigdio Chávez Angel, investigador postdoctoral y tutor de mis prácticas curriculares tecnológicas por el trabajo en equipo y por haberme transmitido con paciencia todos sus conocimientos. Gracias a ellos, la investigación y éste trabajo han sido posibles. Y por último y no menos importante, a mi tutor de Trabajo Final de Grado Robert Soliva Fortuny, por haberme guiado y aconsejado en todo momento. Gracias por haber estado siempre tan disponible.

10. Bibliografía

1. *Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español*. 155 (1967).
2. Pastrana Moncayo, L. TRABAJO FIN DE GRADO Análisis de la calidad del aceite de oliva virgen: relación entre la estabilidad oxidativa y la composición fenólica. (2016).
3. Clases o tipos de aceites de oliva | BioRincon Blog. 31/03/2011 Available at: <http://blog.biorincon.es/clases-de-aceites/>. (Accessed: 3rd April 2018)
4. Harwood, J. & Aparicio, R. *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*. (2013).
5. Consorcio BEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Base de Datos BEDCA. Available at: <http://www.bedca.net/bdpub/>. (Accessed: 22nd March 2018)
6. Perez Jimenez, F. and others. International conference on the healthy effect of virgin olive oil- consensus report. *Eur. J. Clin. Invest.* (2004).
7. Información nutricional del Aceite de oliva, calorías, composición y tabla de valores nutricionales. Available at: <http://www.dietaynutricion.net/informacion-nutricional-de/aceite-de-oliva/>. (Accessed: 22nd March 2018)
8. Lozano Sánchez, J., Segura Carretero, A. & Fernández Gutiérrez, A. Composición del aceite de oliva. Available at: https://www.economiaandaluza.es/sites/default/files/capitulo_7_0.pdf. (Accessed: 2nd July 2018)
9. Diferencias entre Aceite de Oliva y Aceite de Oliva Virgen Extra. Available at: <https://teleoliva.com/diferencias-aceite-oliva-aceite-oliva-virgen-extra/>. (Accessed: 3rd April 2018)
10. Carretto, M. V., Cuervo, M. P., Dirienzo, M. G., Victoria, M. & Vito, D. ACEITE DE OLIVA: BENEFICIOS EN LA SALUD. *Inven. Junio* (2002).
11. ÁCIDO OLEICO » Conoce Propiedades Y Beneficios De Este Ácido Graso. Available at: <https://acidos.info/oleico/>. (Accessed: 17th May 2018)
12. Los Polifenoles del Aceite de Oliva | Las Valdesas. Available at: <https://www.aceitedelasvaldesas.com/faq/propiedades-composicion-aceite-oliva/polifenoles-aceite-de-oliva/>. (Accessed: 17th May 2018)
13. Información general sobre el aceite de oliva. Available at: http://www.aytojaen.es/portal/RecursosWeb/DOCUMENTOS/1/0_10323_1.pdf. (Accessed: 26th June 2018)
14. ¿Hay realmente diferencia entre un aceite de oliva virgen y otro normal? Available at: https://www.eldiario.es/consumoclaro/comer/aceite_de_oliva_virgen_extra_diferencias_0_635537148.html. (Accessed: 4th April 2018)
15. ¿Sabes por qué el precio del aceite de oliva está por las nubes? Available at: <http://www.elcomercio.es/gastronomia/noticias/201706/04/sabes-precio-aceite-oliva-20170604162926.html>. (Accessed: 9th June 2018)
16. Nuevos marcadores de adulteraciones en aceites de oliva. VICERRECTORADO DE INNOVACIÓN Y NUEVAS TECNOLOGÍAS NOTA DE PRENSA OTRI – Información y divulgación científica. (2011).

17. Enrique Fuentes Ibáñez, otra vez detenido por adulterar aceites. Available at: <http://www.diariojaen.es/al-dia/enrique-fuentes-ibanez-otra-vez-detenido-por-adulterar-aceites-NI1587843>. (Accessed: 16th April 2018)
18. Piné, R. Q., Jesús, J., Corona, D., Segura Carretero, A. & Fernández Gutiérrez, A. Técnicas de análisis del aceite de oliva.
19. Sepa lo que come: El aceite de oliva: calidad y fraudes. Available at: <http://sepaloquecome.blogspot.com/2018/05/el-aceite-de-oliva-calidad-y-fraudes.html>. (Accessed: 28th June 2018)
20. Tay, A., Singh, R. K., Krishnan, S. S. & Gore, J. P. Authentication of Olive Oil Adulterated with Vegetable Oils Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (2002). doi:10.1006/fstl.2001.0864
21. Dais, P. *et al.* Comparison of Analytical Methodologies Based on ^1H and ^{31}P NMR Spectroscopy with Conventional Methods of Analysis for the Determination of Some Olive Oil Constituents. doi:10.1021/jf061601y
22. El-Abassy, R. M., Donfack, P. & Materny, A. Visible Raman spectroscopy for the discrimination of olive oils from different vegetable oils and the detection of adulteration. *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1284–1289 (2009).
23. Ember, K. J. I. *et al.* Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *npj Regen. Med.* **2**, 12 (2017).
24. Hernández Trigo, J. A. Teoría y experimentació en espectroscòpia Raman modular amb fibra òptica aplicada a l'anàlisi de pigments. (Universitat Politècnica de Barcelona, 2011).
25. Reinoso, M. Espectroscopía Raman.
26. Baeten, V. & Aparicio Ruíz, R. Posibilidades de las técnicas espectroscópicas infrarroja y Raman para la autenticación del aceite de oliva virgen. *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional* 38–43 (1997).
27. Raman bands explained. Available at: <http://www.renishaw.de/de/raman-bands-explained--25808>. (Accessed: 23rd March 2018)
28. Borbón Nuñez, H. A. Aspectos Teóricos Luminiscencia.
29. Díaz Montaña, E. J. DESARROLLO DE UN MÉTODO VERDE PARA EVALUAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES. (Universidad De Sevilla, 2017).
30. Kyriakidis, N. B. & Skarkalis, P. Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils. *J. AOAC Int.* **83**, 1435–9
31. Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid. Espectroscopía Brillouin. Available at: <http://www.icmm.csic.es/es/divulgacion/posters/TEC-Espectroscopia BRILLOUIN.pdf>. (Accessed: 23rd March 2018)
32. Kwon, S., Lee, J. & Kim, D. H. Reliability of thermal conductivity measurement of liquids by using transient hot-wire, photon-correlation spectroscopy and the laser flash method. *J. Korean Phys. Soc.* 1145–1155 (2016).
33. Cahill, D. G. Thermal conductivity measurement from 30 to 750 K: The 3ω method. *Rev. Sci. Instrum.* **73**, 3701 (2002).
34. Chen, F., Shulman, J., Xue, Y., Chu, C. W. & Nolas, G. S. Thermal conductivity measurement

- under hydrostatic pressure using the 3ω method. *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 4578–4584 (2004).
35. Oh, D. W., Jain, A., Eaton, J. K., Goodson, K. E. & Lee, J. S. Thermal conductivity measurement and sedimentation detection of aluminum oxide nanofluids by using the 3ω method. *Int. J. Heat Fluid Flow* **29**, 1456–1461 (2008).
 36. Lubner, S. D. et al. Reusable bi-directional 3ω sensor to measure thermal conductivity of 100- μ m thick biological tissues. *Rev. Sci. Instrum.* **86**, (2015).
 37. Rodriguez-Laguna, M. R. et al. Mechanisms behind the enhancement of thermal properties of graphene nanofluids. *unpublished* (2018).
 38. Dames, C. Measuring the thermal conductivity of thin films: 3ω and related electrothermal methods. *Annu. Rev. Heat Transf.* **16**, 7–49 (2013).
 39. Cahill, D. G. Thermal conductivity measurement from 30 to 750 K: the 3ω method. *Rev. Sci. Instrum.* **61**, 802 (1990).
 40. Zou, M.-Q. et al. Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6001–6006 (2009).
 41. Mancheño Corro, M. Á. Decisión del momento de recolección, según la composición de ácidos grasos de la aceituna intacta, mediante espectroscopía NIR. (Universidad De Sevilla, 2016).
 42. Turgut, A., Tavman, I. & Tavman, S. Measurement of Thermal Conductivity of Edible Oils Using Transient Hot Wire Method. *Int. J. Food Prop.* **12**, 741–747 (2009).
 43. El cambio de color de un láser verde al atravesar aceite de oliva virgen | Ciencia | La Ciencia de la Mula Francis. Available at: <https://francis.naukas.com/2018/02/05/el-cambio-de-color-de-un-laser-verde-al-atravesar-aceite-de-oliva-virgen/>. (Accessed: 2nd April 2018)
 44. DLE: fluorescencia - Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario. Available at: <http://dle.rae.es/?id=I8Lqq9N>. (Accessed: 3rd April 2018)